

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

02P 18150

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Übersetzung der
europäischen Patentschrift

87 EP 0 553 195 M1

10 DE 691 26 535 T 2

51 Int. Cl. 6:
A 61 K 9/50
C 08 G 81/00

21	Deutsches Aktenzeichen:	691 26 535.6
86	PCT-Aktenzeichen:	PCT/US91/07051
86	Europäisches Aktenzeichen:	91 918 587.6
87	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 92/06678
86	PCT-Anmeldetag:	25. 9. 91
87	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	30. 4. 92
87	Erstveröffentlichung durch das EPA:	4. 8. 93
87	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	11. 6. 97
47	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	25. 9. 97

30 Unionspriorität:

598880 15.10.90 US

73 Patentinhaber:

Board of Regents, The University of Texas System,
Austin, Tex., US

74 Vertreter:

Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,
80538 München

84 Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL,
SE

72 Erfinder:

HUBBELL, Jeffrey, A., Austin, TX 78741, US;
SAWHNEY, Amarpreet, S., Austin, TX 78741, US

54 BIOKOMPATIBLE MIKROKAPSELN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 691 26 535 T 2

DE 691 26 535 T 2

5

BIOKOMPATIBLE MIKROKAPSELN

BESCHREIBUNGHintergrund

10

Die Mikroinkapselung von Materialien für den Transport zu und/oder das Wachstum in einem Tier ist ein Forschungsgebiet, das derzeit viel Interesse anzieht. Die Verwendung von Mikrokapseln stellt das Potential für derartig medizinisch wichtige Verfahren, wie die Behandlung von Insulin-abhängigem Diabetes mellitus (IDDM) bei Menschen durch die Transplantation Insulin-herstellender Zellen und die zeitbestimmte Freisetzung oder langfristige Abgabe von Arzneimitteln an ein Tier, zur Verfügung.

Die Mikroinkapselungs-Membran spielt eine entscheidende Rolle bei der Behandlung von IDDM durch mikroeingekapselte Inselzellen, als auch der Behandlung anderer Krankheiten mit anderem eingekapselten Material. Sie muß nicht nur die Proteine des Immunsystems daran hindern, in die Kapsel einzudringen, sondern sie muß auch auf biokompatible Weise mit den Wirtsgeweben wechselwirken. In diesem Sinn bedeutet Biokompatibilität, daß die Membran keine entzündliche Antwort hervorrufen wird, und daß sie die Zelladhäsion nicht fördern und die Überwachung nicht stimulieren wird. Wenn eine Überwachung auftritt, wird die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr zu den Inselzellen eingeschränkt, und sie werden absterben. Das Fachgebiet der Biokompatibilität von Mikrokapseln hat jedoch verhältnismäßig geringe Aufmerksamkeit erhalten.

Das Prinzip der Immunisolation besteht darin, die Zellen mit einer biokompatiblen semi-permeablen Membran zu umgeben, welche die freie Diffusion von Nährstoffen, Botschafterverbindungen, Zellabfällen und Zellprodukten gestattet, während die Zellen vor dem Immunsystem des Wirts isoliert sind. Die Zellen können individuell oder in einer Gewebeanhäufung vorliegen. Die Botschafterverbindungen und Zellprodukte schließen Glucose, Ca^{2+} und Insulin ein.

35

Es existieren zwei Verfahren für die Immunisolation von Zellen: Hohlfaser-Vorrichtungen und Mikroinkapselung. Eine Form von Hohlfaser-Vorrichtungen ist ein künstliches Kapillarsystem, das aus Hohlfasern besteht, an welche Zellen auf deren Außenseiten angeimpft werden,

- und welche in einer starren Kammer eingeschlossen sind, welche mit dem Empfänger als ein Gefäß-Nebenschluß verbunden ist. Frühere Vorrichtungen, welche Insulin-herstellende Zellen einsetzen, kehrten Diabetes mit hohen Dosierungen von Heparin über begrenzte Zeitdauern hin um; Sun et al. (1977) Diabetes, 26: 1136-39. Aber selbst mit Heparin war die Blutgerinnung ein größeres Problem. Um die Bildung von Gerinnseln, welche die Zellen ersticken ließen, zu vermindern, haben Altman et al. (1986) erfolgreich Amicon-Fasern angeimpft, wobei nahezu die Hälfte der Empfängertiere über ein Jahr lang normale Blut-Glucosespiegel aufwiesen; Altman et al. (1986) Diabetes, 35: 625-33. Die Amiconfasern sind jedoch zerbrechlich, und sie besitzen eine begrenzte Oberfläche, die für Diffusion zur Verfügung steht. Eine U-förmige Ultrafiltrations-Auslegung, die von Reach et al. entwickelt wurde, kann das Diffusionsproblem lösen, aber diese Auslegung wird noch von der Zerbrechlichkeit der Amicon-Fasern und von der Bildung von Blutgerinnseln an der Verbindungsstelle mit dem Gefäßsystem beeinträchtigt; Reach et al. (1984) Diabetes, 33: 752-61.
- Die Transplantation von mikroeingekapselten Zellen oder Gewebe kann die mit Hohlfasern assoziierten Probleme der Diffusionseinschränkungen und Gefäßkomplikationen überwinden. Ursprünglich demonstrierten Sun und Lim die Technik durch Einkapseln von Inselzellen aus der Ratten-Bauchspeicheldrüse in eine Membran, welche aus Schichten von Alginat, Polylysin und Polyethylenimin aufgebaut war; Sun und Lim (1980) Science, 210: 908-910. Die Mikrokapseln wurden in chemisch induzierte diabetische Ratten injiziert. Diese Mikrokapseln korrigierten den diabetischen Zustand lediglich 2 bis 3 Wochen lang.

Schrittweise hat sich die Technik verbessert. Eine große Verbesserung bestand in der Herstellung der vielschichtigen Membran aus Alginat-Polylysin-Alginat, welche fester ist und steuerbare Permeabilitäts-Parameter aufweist; Goosen et al. (1985) Biotech. and Bioengin., XXVII: 146-50. King und Goosen et al. entwickelten Verfahren zur Verringerung der Viskosität des Gels im Inneren, so daß das Gewebe oder die Zellen in einer natürlicheren Umgebung vorliegen; (1987) Biotechnology Progress, 3: 231-240. Ein weiterer Fortschritt bestand in der Herstellung der Mikrokapseln in einer gleichförmigeren, glatten, sphärischen Gestalt, welche ihre Festigkeit verbesserte; Walter et al., Poster-Gruppe H.

Mit diesen Veränderungen haben Sun et al. Langerhanssche Inseln aus Ratten in chemisch induzierte diabetische Ratten transplantiert, welche den diabetischen Zustand bis zu 780 Tage lang umkehrten; Sun (1987), Trans Am. Soc. Artif. Intern Organs, XXXIII: 787-790. *In vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, daß Antikörper aus menschlichen Patienten mit Diabetes vom Typ 1 nicht in der Lage waren, eingekapselte Zellen zu unterdrücken; Darquy and Reach (1985), Diabetologia, 28: 776-80. Deshalb scheint es so, daß die Mikroeinkapselung Zellen vor Antikörpern schützen kann. Jedoch bestehen noch mehrere ernste Probleme hinsichtlich der

Biokompatibilität. Sun hat über das Auffinden von fibroblastenähnlichen Zellen auf den äußeren Oberflächen von intakten Mikrokapseln berichtet. Sun hatte die mikroeingekapselten Ratten-Inselzellen in diabetische Ratten transplantiert; Sun (1987) Trans Am. Soc. Artif. Intern Organs, XXXIII:787-790. In seinen Artikeln hat Sun spezifisch die Notwendigkeit zur Verbesserung der Biokompatibilität der Mikrokapseln erkannt; ebenda auf S.810.

In anderen veröffentlichten Untersuchungen war diese entzündliche Antwort auf transplantierte mikroeingekapselte Zellen ebenfalls ersichtlich. In einer weiteren Untersuchung von mikroeingekapselten Ratten-Inselzellen stellten O'Shea und Sun fest, daß die Mikrokapseln, welche sie in chemisch induzierte diabetische Mäuse transplantiert hatten, eine Zellüberwachung im Bereich von 0-10 Zellschichten aufwiesen. Die überwachsenden Zellen umfaßten Fibroblasten, makrophagenähnliche Zellen und Neutrophile. Es war auch Kollagen um die Kapseln herum vorhanden; O'Shea und Sun (1986), Diabetes, 35:943-946. Wiederum erkannten O'Shea und Sun ausdrücklich, daß die Biokompatibilität der Mikrokapseln verbessert werden muß; ebenda auf S. 946.

Die Entzündungsantwort ist nicht auf Transplantate von Inselzellen beschränkt. Wong und Chang haben über das Zurückgewinnen von verklumpten Mikrokapseln von Ratten-Hepatozyten berichtet, nachdem diese in Mäuse mit Leberschaden transplantiert worden waren. Sie fanden keine lebensfähigen Zellen innerhalb der verklumpten Mikrokapseln, welche nur sieben Tage nach der Transplantation zurückgewonnen worden waren; Wong und Chang (1988) Biomat., Art. Cells, Art. Org., 16(4): 731-739. Die Zellen starben wahrscheinlich, weil sie von Nährstoffen abgeschnitten wurden, als die Zellen die semipermeable Membran überwuchsen.

Derzeitige Zubereitungen für Mikrokapseln resultieren in Algin--polykationisches Polymer--Algin-Verbundstrukturen. Die Außenseite dieser Membranen ist aufgrund des Algins negativ geladen und kann aufgrund des freiliegenden Polykations positive Ladungen aufweisen; als solche unterstützen sie die Proteinadsorption und die Zellanheftung. Im allgemeinen werden diese Mikrokapseln von Fibroblasten und anderen Zellen überwachsen. Dieses Überwachsen hat viele negative Wirkungen, einschließlich einer Störung des Funktionierens der Mikrokapsel durch Blockieren der Permeabilität, und einer Einleitung einer Immunantwort durch das Wirtstier.

Die Mikroeinkapselungs-Technik, welche bisher den besten Erfolg hatte, ist diejenige von O'Shea und Sun (1986), Diabetes, 35: 943-946. Ihr Verfahren verwendet die starke Wechselwirkung zwischen großen vielfach geladenen Molekülen, einem kationischen und einem anionischen, um eine sehr dünne, stabile, sphärische Membranhülle zu bilden, welche

beständig gegen die Diffusion großer Proteine, wie Antikörpern, ist, während die Diffusion kleinerer Proteine, wie Insulin, gestattet wird.

5 Eine derartige Membran wird durch Suspendieren der einzukapselnden Zellen in einer Lösung von Algin, einem polyanionischen Polysaccharid, welches aus Braunalgen erhalten wird, erhalten. Es werden sehr kleine Tröpfchen dieser Lösung gebildet, in Abhängigkeit von der Größe des einzukapselnden Materials etwa von 0,1-1,0 mm Durchmesser, und diese Tröpfchen werden beim Kontakt mit einer ziemlich hoch konzentrierten Lösung von Calciumchlorid, 0,2 - 1,6 % CaCl_2 , geliert. Die Calciumkationen dienen in dieser hohen Konzentration dazu, die anionischen Polysaccharidketten reversibel zu vernetzen, wodurch das Gel gebildet wird.

15 Um eine Membran zu erhalten, welche bei physiologischen Calcium-Konzentrationen stabil ist, wird die negativ geladene Mikrokapsel in eine Lösung eines positiv geladenen Polymers, zum Beispiel Polylysin, gebracht. Die entgegengesetzten Ladungen interagieren, was zu einer sehr starken Adsorption des Polylysins führt und in einer stabilen, stark vernetzten Oberfläche resultiert. Auf ähnliche Weise wird eine äußere Schicht aus Algin hinzugefügt, wodurch eine zusammengesetzte Algin-Polylysin-Algin-Verbund-Dreischichtmembran erhalten wird.

20 Der feste innere Kern aus geliertem Algin wird durch Einbringen der Mikrokapseln in eine Lösung aus Natriumcitrat, um das geliierende Calcium als Chelat zu komplexieren, verflüssigt. Bei physiologischen Calciumspiegeln bleibt der Kern flüssig, und das Algin, falls von genügend niedrigem Molekulargewicht, diffundiert aus dem Kern. Das Ergebnis ist eine sphärische Schale aus Algin-Polylysin-Algin, welche die mikroeinkapselten Zellen umgibt.

25 Es ist vorhersagbar, daß eine derartige Algin-Polylysin-Algin-Mikrokapsel einer Überwachung durch Gewebe nicht widerstehen wird. Die äußere Oberfläche ist stark geladen, sowohl mit positiven als auch negativen Ladungen, und man würde daher von dieser erwarten, daß sie bedeutende Mengen an Protein adsorbiert und die Zelladhäsion fördert; Andrade et al. (1986), Adv. Polymer Sci., 79: 1-63. Experimentell ist beobachtet worden, daß die Gewebeüberwachung der Schwachpunkt der Mikroeinkapselungs-Therapie ist; O'Shea und Sun (1986).

30 In zahlreichen Fällen ist Poly(ethylenoxid) (PEO) verwendet worden, um die Zellanheftung zu verringern. Zum Beispiel wurde von PEO-Überzügen auf PVC-Schläuchen berichtet, die Plättchen-Adhäsion in vitro signifikant zu vermindern und die Adhäsion und Thrombus-Bildung in 72-Tage-PVC-Schlauchimplantaten in vivo zu verhindern (Y. Mori et al., Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 28: 459 (1982)). Die Volumenbeschränkungs- und osmotischen Abstoßungs-Effekte wurden der Erzeugung einer geringen Adsorption von Blutbestandteilen zugeschrieben; (ebenda). Spätere Forschungsarbeiten kamen zum Ergebnis, daß Mikro-

strömungen von Wasser auftraten, welche durch die wimpernartigen Bewegungen hydratisierter PEO-Ketten hervorgerufen wurden, welche die Plasmaproteine daran hindern, auf die Oberfläche der beschichteten PVC-Schläuche zu absorbieren; (S. Nagaoka und A. Nakao, *Biomaterials* 11:119 (1990)).

5

Zusätzlich zu den PVC-Schlauch-Beschichtungen ist von anderer Seite berichtet worden, daß segmentierte Polyurethane mit PEO als dem weichen Segment beim Gießen als Folien oder Beschichtungen eine verringerte Plättchenzurückhaltung in vitro aufweisen (E. W. Merrill et al., *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 28:482 (1982)). Es wurde gezeigt, daß PEG-Polyurethanbeschichtungen auf aus Pellethane hergestellten Scheiben bewirken, daß die
10 Scheiben bei Implantation in die Bauchhöhlen von Mäusen bis zu 3 Monate lang eine verminderte zelluläre Adhäsion aufweisen (S. K. Hunter et al., *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 29:250 (1983)). Es wurde festgestellt, daß aus Poly(N-Acetylenimin) und PEO bestehende Blockcopolymere bei Aufbeschichtung auf Feststoffe, wie Glaskügelchen oder
15 Silica, die Homöo-Kompatibilität der Feststoffe durch Verringerung der Adsorption hydrophiler Makromoleküle erhöhen (C. Maechling-Strasser et al., *J. of Biomedical Materials Research* 23:1385 (1989)).

Langzeitimplantate in Hundengefäße aus mit Polymeren beschichtetem Biomer sind hinsichtlich
20 der Adsorption von Proteinen getestet worden (C. Nojiri et al., *Trans. Am. So. Artif. Intern. Organs*, 35:357 (1989)). Die Polymerbeschichtungen, von denen festgestellt wurde, "hervorragende nicht-thrombogene Eigenschaften" aufzuweisen, waren: 1) unter Verwendung eines langkettigen PEO-Abstandhalters auf Biomer immobilisiertes Heparin; und 2) ein aus 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Styrol zusammengesetztes Blockcopolymer; (ebenda).

25

Es wurde gezeigt, daß Polyethylen von geringer Dichte (eine hydrophobe Polymeroberfläche), welches mit einem Blockcopolymer, das wasserunlösliche Komponenten (wie Polypropylenoxid oder Polybutylenoxid) und PEO-Komponenten (wasserlösliche Komponenten) enthielt, beschichtet war, proteinbeständige bzw. -widerstandsfähige Eigenschaften aufweist;
30 (J. H. Lee et al., *J. of Biomedical Materials Research*, 23:351 (1989)). Die Oberfläche wurde durch ein einfaches Beschichtungsverfahren erzeugt, worin die hydrophoben Bestandteile des Polymers aus einer wäßrigen Lösung heraus auf die hydrophobe Oberfläche des Polyethylens adsorbierten, und die PEO-Ketten dann wenigstens teilweise in die wäßrige Lösung hinein verlängert wurden, wodurch eine Protein-widerstandsfähige Oberfläche erzeugt wurde;
35 (ebenda).

Es sind Verfahren, welche verwendet wurden, um PEO-Oberflächen zu erhalten, beschrieben worden, die von einem einfachen Beschichtungsverfahren verschieden sind: Blockcopoly-

merisation (Y. Mori siehe oben); Einbau in Polyurethane (E.W. Merrill siehe oben); und direkte Anheftung von PEO-Molekülen an die Cyanurchlorid-aktivierte Oberfläche einer Poly-(ethylenterephthalat)-Schicht; (W. R. Gombotz et al., J. of Applied Polymer Science 37:91 (1989)).

- 5 Das U.S.-Patent Nr. 4 806 355 offenbart die Herstellung von Mikrokapseln, welche eine negativ geladene äußere Oberfläche einschließen. Das U.S.-Patent Nr. 4 352 883 offenbart Kapseln mit einer semipermeablen Membran, welche durch ionisches Vernetzen eines Polysaccharids mit mehrwertigen Kationen unter Bildung eines Gels und danach Vernetzen einer Oberflächenschicht des Gels durch ionisches Umsetzen der Oberfläche mit einem
- 10 Polyamin oder Polyimin gebildet werden. Die WO-A-8800237 offenbart eingekapselte Gelkugeln mit einer kovalent vernetzten semipermeablen Membran. Kiss et al., Progress in Colloid & Polymer Science, 74:113-119 (1987), offenbart ein Verfahren zum Pfropfen von Polyethylenoxid auf feste Polyethylen-Substrate. Die WO-A-9205201 offenbart ein Verfahren zur Bindung von Proteinen an eine feste organische Polymeroberfläche, welche mit einer
- 15 hydrophilen ungeladenen Schicht überzogen ist. Die EP-A-0 354 855 offenbart ein Verfahren zur Herstellung von Liposomen mit darin eingebauten Polyethylenglykol-gebundenen Phospholipiden zur Verminderung der Absorption von Proteinen.

- H.Bader et al., "Water Soluble Polymers in Medicine", Die Ang. Makromol. Chem. 123/124:457-485 (1984), ist ein Überblick über die Verwendung von Liposomen und verwandten Strukturen als Arzneimittelträger, welcher Konjugate aus Polyethylenoxid und einem Polylysin-Arzneimittelderivat beschreibt, die in wäßriger Lösung micellare Strukturen bilden. H. Anzinger et al., Makromol. Chem. Rapid Comm. 2: 637-643 (1981), und M.K. Pratten et al., Makromol. Chem. 186:725-733 (1985), beschreiben die Synthese ähnlicher
- 20 micellarer Strukturen.
- 25

- Die meisten der vorstehenden Anwendungen von PEO haben auf konkaven oder flachen Oberflächen stattgefunden; sie haben nicht stattgefunden auf kleinen konvexen Oberflächen, wie sie bei Mikrokapseln angetroffen werden. Aufgrund der Tatsache, daß die nichtionischen wasserlöslichen Polymere von der Mikrokapsel nach außen weisen, konnte aus dem Stand der
- 30 Technik nicht vorhergesagt werden, daß PEO und andere nichtionische wasserlösliche Polymere eine hinreichende Barriere bilden könnten, um Mikrokapsel-Oberflächen zu schützen. Ähnlicherweise war die Chemie zur Anbindung ausreichender Mengen von wasserlöslichen nichtionischen Polymeren an die äußeren Oberflächen von Mikrokapseln, um diese Barriere zu
- 35 erzeugen, nicht bekannt.

Die vorliegende Erfindung stellt eine biokompatible Mikrokapsel zur Transplantation in ein Tier zur Verfügung, wobei die Mikrokapsel eine Membran von mehr als einer Schicht umfaßt,

worin die äußerste polykationische Schicht der Membran ionisch mit einer anderen Membranschicht vernetzt ist und aus einem, auf ein polykationisches Polymer gepfropften, wasserlöslichen nichtionischen Polymer von zwischen 2 000 und 50 000 Dalton aufgebaut ist.

- 5 Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung eines auf ein polykationisches Polymer gepfropften wasserlöslichen nichtionischen Polymeren zur Verfügung, welches folgendes umfaßt:

10 (a) Aktivieren der reaktiven Gruppen, welche fähig sind, an ein Kopplungsmittel auf dem wasserlöslichen nichtionischen Polymer kovalent gebunden zu werden, durch Verwendung eines Carbodiimidazol-, Sulfonylchlorid- oder Chlorcarbonataktivierungsmittels, und

(b) Koppeln des aktivierten wasserlöslichen nichtionischen Polymers an ein polykationisches Polymer.

- 15 Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Herstellung einer biokompatiblen Mikrokapsel, wie obenstehend definiert, zur Verfügung, welches folgendes umfaßt:

20 a) Aktivieren der reaktiven Gruppen, welche fähig sind, an ein Kopplungsmittel auf einem wasserlöslichen nichtionischen Polymer kovalent gebunden zu werden, und

b) Koppeln des aktivierten wasserlöslichen nichtionischen Polymeren an ein polykationisches Polymer unter Bildung eines Pfropfcopolymeren,

- 25 c) ionisches Vernetzen des Pfropfcopolymeren an eine äußerste Schicht einer Mikrokapsel-Membran.

30 Diese Erfindung zeigt zum ersten Mal die Verwendung von wasserlöslichen nichtionischen Polymeren, wie PEO, um Beständigkeit gegen Zelladhäsion auf der Oberfläche von Mikrokapseln hervorzurufen.

35 Mittels der vorliegenden Erfindung kann Fremdmaterial auf eine biokompatible Weise in einen Tierkörper transplantiert werden. Dies wird durch Bereitstellen von mit dem Empfängertier biokompatiblen Mikrokapseln bewerkstelligt, welche fähig zum Einkapseln des in das Tier zu transplantierenden Fremdmaterials sind. Die normalerweise geladene äußere Schicht der Mikrokapseln wird mit wasserlöslichen nichtionischen Polymeren, wie Poly(ethylenoxid) (PEO), welche zur Abschirmung der Ladung dienen, umhüllt. Diese Polymere werden in einer solchen Weise auf die polykationischen Polymere, wie die als mindestens eine der Schichten

der Mikrokapsel verwendeten Poly-L-Lysin (PLL)-Moleküle, gepfropft, daß sie eine nichtionische Barriere zwischen der äußeren Schicht der Mikrokapsel (hergestellt im wesentlichen aus entweder polykationischen Polymeren, wie PLL, oder polyanionischen Polymeren, wie Alginat) und dem Empfängertier bilden. Die Mikrokapseln schienen dann von der Außenseite her wasserähnliche Oberflächeneigenschaften zu besitzen, wodurch die treibende Kraft für die Proteinadsorption vermindert wird. Ferner befindet sich die Oberfläche auf der makromolekularen Ebene in einem hohen Bewegungsgrad, was Proteinadsorption und Zellanheftung weiter vermindert.

Die Mikrokapseln der vorliegenden Erfindung haben eine Oberfläche, welche widerstandsfähiger gegen Zelladhäsion ist. Als Ergebnis wird das Überwachsen der Mikrokapseln mit Zellen, wie Fibroblasten und Makrophagen, stark vermindert oder ausgeschaltet. Die innerhalb der Mikrokapseln enthaltenen Zellen sind in der Lage, damit fortzufahren, Nährstoffe und Signalmoleküle zu empfangen und ein beliebiges gewünschtes Produkt herzustellen. Jegliches in den Mikrokapseln vorhandenes Produkt, wie von Inselzellen hergestelltes Insulin, kann weiterhin aus den Mikrokapseln diffundieren und für die Verwendung durch das Wirtstier zur Verfügung stehen.

Die Mikrokapseln der vorliegenden Erfindung werden die Immunantwort oder Cytokin-freisetzung durch das Empfängertier nicht merklich stimulieren. Daher können diese Mikrokapseln in ein Empfängertier transplantiert werden und dort bei minimaler Störung durch das Immunsystem dieses Tiers wirken.

Die Mikrokapseln der vorliegenden Erfindung können variable Permeabilitätshöhen aufweisen. Dies wird durch Verwendung variierender Zahlen von Schichten zur Herstellung der Mikrokapseln bewirkt, wobei eine erhöhte Anzahl von Schichten die Porengröße vermindert. Somit können die Mikrokapseln hergestellt werden, um einer besonderen Anforderung nach großen oder kleinen Poren und dem resultierenden Grad an Permeabilität zu begegnen.

Figuren

Die Figur 1 zeigt den Effekt des Molekulargewichts des wasserlöslichen nichtionischen Polymers auf die Permeabilität der unter Verwendung des gepfropften Materials hergestellten Mikrosphären.

Die Figur 2 zeigt den Effekt der Anzahl zur Herstellung der Mikrosphären verwendeter Schichten auf die Permeabilität.

Die Figur 3 ist ein Schema der Aktivierungsreaktion unter Verwendung von Carbodiimidazol.

Die Figur 4 ist ein Schema der Aktivierungsreaktion unter Verwendung von Sulfonylchloriden, wobei R wie gezeigt beschaffen ist.

Die Figur 5 ist ein Schema der Aktivierungsreaktion unter Verwendung von Chlorcarbonaten.

Die Figur 6 zeigt die aus einer Bauchhöhlenspülung nach einer Implantation von Mikrokapsein erhaltenen Zell-Zählungen. CDI (Carbodiimidazol), PFBS (Pentafluorbenzolsulfonylchlorid), Trifyl (Triflylchlorid) und Chlorocarb (Chlorcarbonat) wurden verwendet, um PEO (Poly(ethylenoxid)) für das Pfropfen auf Poly-(L-Lysin) gemäß dieser Erfindung zu aktivieren. Die Figur 6a stellt die Ergebnisse bei Verwendung von PEO mit einem Molekulargewicht von etwa 5 kD dar; die Figur 6b wendete PEO von 10 kD an; und die Figur 6c zeigt Ergebnisse mit PEO von 18,5 kD. Die Zellzahlen sind auf der linken Seite jeder Graphik gezeigt. $e+7$ bedeutet 10^7 , so daß 1,00e+7 für $1,00 \times 10^7$ Zellen steht.

Die Figur 7 zeigt das Wachstum von Zellen auf Mikrosphären, welche durch die vor dieser Erfindung verfügbaren Standard-Verfahren unter Verwendung von nicht-gepfropftem Poly-(L-Lysin) hergestellt wurden. Die Figur 7a ist eine 40fache Phasenkontrast-Vergrößerung von Mikrosphären, während die Figur 7b eine 400fache ist.

Die Figur 8 zeigt Mikrosphären, die mit Poly(ethylenoxid) (PEO) hergestellt wurden, welches durch Carbodiimidazol aktiviert und auf Poly(L-Lysin) (PLL) gepfropft worden war, um PEO-g-PLL zu erzeugen. In der Figur 8a wurde PEO von 5 kD verwendet; in der Figur 8b PEO von 10 kD, und in der Figur 8c wies das PEO 18,5 kD auf. Diese Figuren zeigen die 40fach vergrößerten Gesamtmikrosphären.

Die Figur 9 zeigt mit PEO hergestellte Mikrosphären, welches durch Triflylchlorid aktiviert und auf PLL gepfropft worden war, um PEO-g-PLL zu erzeugen. In den Figuren 9a und 9b wurde 5 kD-PEO verwendet. In den Figuren 9c und 9d wies das PEO 10 kD auf, und in den Figuren 9e und 9f wies das PEO 18,5 kD auf. Die Figuren 9a, 9c und 9e zeigen Gesamtmikrosphären, photographiert bei 40 x, während die Figuren 9b, 9d und 9f 400fach vergrößerte Oberflächen der Mikrosphären zeigen.

Die Figur 10 zeigt mit PEO hergestellte Mikrosphären, welches mittels Pentafluorbenzolsulfonylchlorid (PFBS) aktiviert und auf PLL gepfropft worden war, um PEO-g-PLL herzustellen. In der Figur 10a wurde PEO von 5 kD verwendet; in der Figur 10b wies das PEO 10 kD auf, und in der Figur 10c wies das PEO 18,5 kD auf. Diese Figuren zeigen die 40fach vergrößerten Gesamtmikrosphären.

Die Figur 11 zeigt mit PEO hergestellte Mikrosphären, welches mittels Chlorcarbonat aktiviert und auf PLL gepropft worden war, um PEO-g-PLL zu bilden. In den Figuren 11a und 11b wurde PEO von 5 kD verwendet. In den Figuren 11c und 11d wies das PEO 10 kD auf, und in den Figuren 11e und 11f wies das PEO 18,5 kD auf. Die Figuren 11a, 11c und 11e zeigen 40fach vergrößerte Gesamtmikrosphären, während die Figuren 11b, 11d und 11f 400fach vergrößerte Oberflächen der Mikrosphären zeigen.

Ausführliche Beschreibung

- 10 Gemäß dieser Erfindung werden Mikrokapseln aus verschiedenen Schichten eines polyanionischen Polysaccharids, wie Alginat, und eines polykationischen Polymers, wie Poly(L-Lysin) (PLL), zusammengefügt. Das polykationische Polymer muß nicht ein Polypeptid sein. Die äußere polykationische Schicht ist aus dem polykationischen Polymer aufgebaut, welches auf ein wasserlösliches nichtionisches Polymer, wie Poly(ethylenoxid) (PEO), gepropft ist, um
- 15 ein Pfropfcopolymeres, wie PLL-g-PEO, zu bilden. Die Schichten wechseln sich auf solche Weise ab, daß die entgegengesetzt geladenen Polymere, zum Beispiel Algin und PLL, aggregieren, um Koazervate, wie Algin-PLL-Algin, zu bilden. Dies erzeugt eine ionisch vernetzte Membran.
- 20 Allerdings ist bekannt, daß PLL die Zelladhäsion fördert, so daß wenigstens die äußerste Schicht aus PLL oder einem anderen Polykationen in dieser Erfindung aus dem Pfropfcopolymeren aufgebaut ist. Von PEO, als auch von anderen wasserlöslichen nichtionischen Polymeren, ist gezeigt worden, daß es bei Verwendung zur Modifikation einer Oberfläche die Zelladhäsion verringert; Lee et al. (1989) J. Biomed. Materials Res. 23:351-368. Dieses
- 25 Pfropfcopolymer mit dualem Charakter interagiert mit der polyanionischen Schicht, wie Algin, wodurch eine stabile Membran über Wechselwirkungen zwischen dem polykationischen Grundgerüst, wie PLL, und der polyanionischen Schicht gebildet wird. Die langen Arme des nichtionischen Polymers, wie PEO, jedoch dienen dazu, die geladenen Schichten von den Geweben abzudecken, wodurch die Biokompatibilität verbessert wird. Sie erzeugen eine sehr
- 30 hydrophile und ungeladene Schicht, an welche, falls überhaupt, sehr wenig Protein oder Zellen anhaften.

Die wasserlöslichen nichtionischen Polymere werden kovalent an die polykationischen Polymere gebunden und weisen in alle Richtungen, einschließlich von der Mikrokapsel her

35 nach außen.

1. Wasserlösliche nichtionische Polymere

Wasserlösliche nichtionische Polymere mit Molekulargewichten zwischen 2 000 und 50 000 sind für dieses Verfahren geeignet. PEO mit einem Molekulargewicht von etwa 10 000 wird am stärksten bevorzugt. Moleküle mit Molekulargewichten unter etwa 2 000 schirmen die Mikrokapsel nicht angemessen ab, wohingegen diejenigen von mehr als etwa 50 000 den Mikrokapseln räumliche Beschränkungen verursachen. Darüberhinaus erzeugen Moleküle mit höheren Molekulargewichten einen Zuwachs der Schwellung der Mikrokapseln, was die Wechselwirkungen zwischen den polyanionischen Polysacchariden und den polykationischen Polypeptiden stört. Als Ergebnis adhäriert die polyanionische Polysaccharidschicht nicht so gut, und es kann zu einer Bedrohung der Unversehrtheit der Mikrokapseln kommen.

Zusätzlich beeinflusst die Größe der wasserlöslichen nichtionischen Polymere die Permeabilität der Mikrokapsel. Die größeren Moleküle erzeugen eine größere Permeabilität. Dieses Merkmal kann manipuliert werden, um den optimalen Permeabilitätsgrad für die jeweilige Anwendung der Mikrokapseln zu erhalten. Für Mikrokapseln, welche Insulin-herstellende Inselzellen einkapseln, wird die optimale Permeabilität mit PEO von einem Molekulargewicht von etwa 10 000 in einer fünfschichtigen Membran erzeugt (siehe nachstehend und die Figuren 1 und 2).

20 2. Aktivierung

Zur Pfropfung des wasserlöslichen nichtionischen Polymeren auf die polykationischen Polymere verwendete Verfahren schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, die Verwendung von Carbodiimidazol, Sulfonylchloriden oder Chlorkarbonaten zur Aktivierung der wasserlöslichen nichtionischen Polymere ein. Diese Reagenzien werden verwendet, um freie Hydroxylgruppen für die Kopplung an polykationische Polypeptide zu aktivieren.

Es können ebenfalls andere, dem Fachmann bekannte, chemische Umsetzungen zur Kopplung von wasserlöslichen nichtionischen Polymeren an polykationische Polymere eingesetzt werden.

30 a. Carbodiimidazol

Zu X Millimol PEO oder eines anderen wasserlöslichen nichtionischen Polymeren in einer mindestens 1%igen Lösung in wasserfreiem Aceton oder einem anderen wasserfreien organischen Lösungsmittel werden mindestens 1 X, bevorzugt 5 X Millimol Carbodiimidazol zugegeben. Es können größere Mengen von Carbodiimidazol verwendet werden, sie werden aber die Geschwindigkeit oder das Ausmaß der Aktivierung nicht steigern. Die Reaktionsmischung wird bei einer Temperatur überhalb des Gefrierpunkts und unterhalb des Siedepunkts

der Mischung, bevorzugt bei Raumtemperatur von etwa 22°C, mindestens 1/2 Stunde lang, bevorzugt etwa 2 Stunden lang, gerührt. Das Produkt wird dann mindestens zweimal mit Methanol mit HCl oder einer anderen starken Säure gewaschen, um die organische Base in das Konjugat umzuwandeln, und schließlich mit reinem Methanol gewaschen. Die Waschschr
5 können durch Solubilisieren des Reaktionsprodukts in dem Waschlösungsmittel, gefolgt von erneuter Fällung und Sedimentation, zum Beispiel durch Absetzen bei 1 g oder in einer Zentrifuge bei einer höheren Beschleunigung, bevorzugt 10 Minuten lang bei 1000 rcf, durchgeführt werden. Durch UV-Spektrophotometrie wird überprüft, daß die letzte Waschung frei von jeglichem restlichen Pyridin oder anderen Base ist. Das pelletierte Produkt wird dann
10 wiedergewonnen. Es können ebenfalls andere dem Fachmann bekannte Reinigungsschemen verwendet werden. Das Produkt kann dann lyophilisiert und aufbewahrt werden. Die Figur 1 zeigt das Reaktionsschema.

b. Sulfonylchloride

15 Um gute Merkmale der austretenden Gruppe bei Sulfonylchloriden zu erzeugen, werden zwei hauptsächliche Verfahrensweisen angewandt: Die erste ist die Fluorierung und die zweite ist die Nitrierung. Somit kann eine Anzahl organischer Chloride verwendet werden, um end-aktivierte wasserlösliche nichtionische Polymerketten bei variierenden Wirkungsgrad herzu-
20 stellen. Zum Beispiel ist die Reihenfolge der Kopplungsreaktivität für Toluolsulfonylchlorid (Tosylchlorid) : Trifluorethansulfonylchlorid (Tresylchlorid) : Trifluormethansulfonylchlorid (Trifylchlorid) 1:100:4000. Mit zunehmender Reaktivität verringert sich die Stabilität. Deshalb wird ein organisches Chlorid mit intermediären Merkmalen bevorzugt. Andere Sulfonylchloride, wie Dansyl-, Dipsyl- und Diabsylchlorid, können ebenfalls, jedoch mit geringerer
25 Wirksamkeit, verwendet werden. Andere Probleme, wie die Schwierigkeit der Entfernung nichtumgesetzter Dansylfunktionen durch Nucleophilie und die Neigung von Diabsylchlorid, weitere Sekundärreaktionen zu durchlaufen, was zu einer signifikanten Rotverschiebung führt, machen diese Sulfonylchloride weniger geeignet. Diese können zum Beispiel durch Anwenden höherer Spiegel des Aktivierungsmittels und anschließender Reinigung der Produkte der
30 Primärreaktion von den Produkten der sekundären, kompetitierenden Reaktionen überwunden werden.

Eine andere Verbindung, Pentafluorbenzolsulfonylchlorid (PFBS), ist jedoch genauso reaktiv wie Tresylchlorid, ist billiger und ist chromophor, wodurch eine einfache Quantifizierung des
35 Ausmaßes der Reaktion ermöglicht wird. Somit ist PFBS ein bevorzugtes Reagenz in dieser Gruppe.

Sulfonylchloride sind von einer Anzahl kommerzieller Chemikalienhersteller, wie Aldrich und Fluka, leicht erhältlich.

5 Zu X Millimol PEO oder eines anderen nichtionischen wasserlöslichen Polymers in einer wenigstens 1%igen Lösung in wasserfreiem Methylenchlorid oder einem anderen wasserfreien organischen Lösungsmittel bei einer Temperatur überhalb des Gefrierpunkts und unterhalb des Schmelzpunkts der Mischung, bevorzugt 4°C, werden mindestens 1 X, bevorzugt 5 X Millimol Sulfonylchlorid (es können größere Mengen verwendet werden, sie werden jedoch die Geschwindigkeit oder das Ausmaß der Aktivierung nicht erhöhen) und etwa zweimal soviel
10 Pyridin, Triethylamin oder eine andere organische aphotische (aphotic) Base, wie Sulfonylchlorid, zugegeben. Die Reaktionsmischung wird mindestens 10 Minuten lang, bevorzugt etwa 2 Stunden lang, gerührt. Das Produkt wird danach mindestens zweimal mit Methanol mit HCl oder einer anderen starken Säure gewaschen, um die organische Base in das Konjugat umzuwandeln, und schließlich mit reinem Methanol gewaschen. Die Waschungen können
15 durch Solubilisieren des Reaktionsprodukts in dem Waschlösungsmittel, gefolgt von erneutem Fällen und Sedimentieren, zum Beispiel durch Absetzen bei 1 g oder in einer Zentrifuge bei einer höheren Beschleunigung, vorzugsweise 10 Minuten lang bei 1000 rcf, durchgeführt werden. Mittels UV-Spektrophotometrie wird überprüft, daß die letzte Waschung frei von jeglichem verbleibenden Pyridin oder einer anderen Base ist. Das pelletierte Produkt wird dann
20 gewonnen. Es können ebenfalls andere dem Fachmann bekannte Reinigungsschemen verwendet werden. Das Produkt kann danach lyophilisiert und aufbewahrt werden. Die Figur 2 zeigt das Reaktionsschema.

c. Chlorcarbonate

25 Chlorcarbonate, wie p-Nitrophenylchlorcarbonat (Fluka), 2,4,5-Trichlorphenylchlorcarbonat und N-Hydroxysuccinamidchlorcarbonat sind Beispiele, welche wirksam für die Aktivierung von Hydroxyl-enthaltenden Verbindungen, wie den in dieser Erfindung verwendeten wasserlöslichen nichtionischen Polymeren, reagieren. Andere dem Fachmann bekannte
30 Chlorcarbonate können ebenfalls verwendet werden.

35 Zu X Millimol PEO oder eines anderen nichtionischen wasserlöslichen Polymers in einer wenigstens 1%igen Lösung in wasserfreiem Methylenchlorid oder einem anderen wasserfreien organischen Lösungsmittel bei einer Temperatur überhalb des Gefrierpunkts und unterhalb des Schmelzpunkts der Mischung, bevorzugt 4°C, werden mindestens 1 X, bevorzugt 5 X Millimol Chlorcarbonat (es können größere Mengen verwendet werden, sie werden jedoch die Geschwindigkeit oder das Ausmaß der Aktivierung nicht erhöhen) und etwa zweimal soviel Pyridin, Triethylamin oder eine andere organische aphotische Base zugegeben. Die Reaktions-

mischung wird bei einer Temperatur überhalb des Gefrierpunkts und unterhalb des Siedepunkts der Mischung, bevorzugt bei Raumtemperatur von etwa 22°C, mindestens 10 Minuten lang, bevorzugt etwa 2 Stunden lang, gerührt. Das Produkt wird danach mindestens zweimal mit Methanol mit HCl oder einer anderen starken Säure gewaschen, um die organische Base in das Konjugat umzuwandeln, und schließlich mit reinem Methanol gewaschen. Die Waschungen können durch Solubilisieren des Reaktionsprodukts in dem Waschlösungsmittel, gefolgt von erneutem Fällern und Sedimentieren, zum Beispiel durch Absetzen bei 1 g oder in einer Zentrifuge bei einer höheren Beschleunigung, vorzugsweise 1000 rcf 10 Minuten lang, durchgeführt werden. Mittels UV-Spektrophotometrie wird überprüft, daß die letzte Waschung frei von jeglichem verbleibenden Pyridin oder einer anderen Base ist. Das pelletierte Produkt wird dann gewonnen. Es können ebenfalls andere dem Fachmann bekannte Reinigungsschemen verwendet werden. Das Produkt kann danach lyophilisiert und aufbewahrt werden. Die Figur 3 zeigt das Reaktionsschema.

15 3. Polykationische Polymere

Polykationische Polymere werden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, feste Membrankoazervate mit Algin oder anderen Polyanionen zu bilden, ausgewählt. Solche polykationischen Polymere schließen Polypeptide und Nicht-Polypeptide ein. Die Polypeptide schließen, ohne darauf eingeschränkt zu sein, Polylysin und Polyornithin ein. Nicht-Polypeptide schließen, ohne darauf eingeschränkt zu sein, Polyethylenimin und Polyallylamin ein. Das Molekulargewicht dieser polykationischen Polymere ist wichtig aber nicht kritisch, und optimale Werte werden durch deren Fähigkeit, feste Membrankoazervate zu bilden, festgelegt. Polykationische Polymere von sehr niedrigem Molekulargewicht bilden im allgemeinen Membranen, welche schwach sind, und polykationische Polymere mit sehr hohem Molekulargewicht bilden im allgemeinen Membrankoazervate, welche sehr dünn sind. Typische Werte für das Molekulargewicht der polykationischen Polymere liegen zwischen etwa 10 000 und 75 000. Ein bevorzugtes Substrat ist Poly-(L-Lysin), das bereits zuvor in seiner nicht-gefropften Form als ein Bestandteil von Mikrokapsel-Membranen verwendet worden ist.

30 4. Kopplung

Aktivierte wasserlösliche nichtionische Polymere werden als nächstes an die polykationischen Polymere gekoppelt. Die Polymere werden in eine Lösung des aktivierten PEO oder eines andern wasserlöslichen nichtionischen Polymers beigemischt, gerührt und über eine Dauer von mindestens 1/2 Tag reagieren gelassen. Der pH-Wert der Lösung wird auf etwa 9 ± 2 gehalten. Die Kopplungsreaktion wird durch Abblocken über die Zugabe eines Amins oder Thiols, wie

Mercaptoethanol, gestoppt. Das Ablocken wird mindestens eine halbe Stunde lang, vorzugsweise 10 Stunden lang, durchgeführt.

- 5 Falls gewünscht, können Ultrafiltration, Dialyse oder Soxlet-Extraktion verwendet werden, um das nicht-umgesetzte PEO von dem PLL-g-PEO abzutrennen. Darüber hinaus kann das Ausmaß der Reaktion unter Verwendung einer spektrophotometrischen Titration der Amingruppen abgeschätzt werden, wobei, zum Beispiel, die Amingruppen mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure umgesetzt werden, wodurch ein Produkt gebildet wird, das bei 440 nm absorbiert. Das Ausmaß der Reaktion kann auch durch Abschätzen der relativen Mengen von Copolymeren
10 unter Verwendung von ^1H -NMR bestimmt werden.

5. Bildung von Mikrokapseln

- 15 Die Bildung der Mikrokapseln erfolgt mittels Standardtechniken; O'Shea und Sun (1986). Das einzukapselnde Material wird in einer Lösung von polyanionischen Polysacchariden, vorzugsweise Algin, bei einer Konzentration suspendiert, welche es den Zellen ermöglichen wird, angemessene Nährstoffe als auch Signalmoleküle zu empfangen und das(die) gewünschte(n) Produkt(e) herzustellen, sobald die Mikrokapseln gebildet sind. Eine bevorzugte Konzentration ist 1×10^5 bis 1×10^8 Zellen/ml. Tröpfchen dieser Lösung werden in eine
20 Lösung von isotonischem Calciumchlorid in Salzlösung, bevorzugt 0,2 bis 1,6 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, eingetropft. Ein Verfahren zur Herstellung der Tröpfchen ist das Durchleiten der Lösung unter Druck durch eine Nadel oder Mündung mit kleinem Durchmesser in einem sterilen-Luftstrom. Sie werden dann in isotonischer Salzlösung oder Puffer gewaschen und in eine Lösung des polykationischen Polymeren, vorzugsweise PLL, eingebracht. Alternativ dazu können sie in
25 eine Lösung des mit dem wasserlöslichen nichtionischen Polymer gepfropften polykationischen Polymer, wie hier beschrieben, eingebracht werden. Die Lösung aus dem polykationischen Polymer oder dem mit dem wasserlöslichen nichtionischen Polymer gepfropften polykationischen Polymer sollte etwa 0,03% - 0,3%ig, bevorzugt 0,1%ig, sein. Die Tröpfchen werden mit den Polymeren über eine Zeitdauer von 3 - 30 Minuten, bevorzugt 12 Minuten, reagieren
30 gelassen.

- Die Mikrokapseln werden zum Beispiel durch Dekantieren der Flüssigkeit aus der Polymer-Lösung entfernt. Die 2-Schicht-Tröpfchen werden dann mit isotonischer Salzlösung oder Puffer gewaschen und können mit einer oder mehreren Schichten aus polyanionischen
35 Polysacchariden, bevorzugt einer weiteren Schicht Algin, überzogen werden. Dies wird durch Umsetzen der zweischichtigen Tröpfchen mit einer 0,05-0,25%igen Lösung des polyanionischen Polysaccharids, vorzugsweise einer 0,15%igen Lösung Algin, über eine Zeitdauer von 3-30 Minuten, bevorzugt von 8 Minuten, bewerkstelligt.

Als Nächstes kann eine Schicht von mit wasserlöslichem nichtionischen Polymer gefropftem polykationischen Polymer, vorzugsweise PEO-g-PLL, der Mikrokapsel hinzugefügt werden. Dies wird durch Inkubation der Mikrokapseln in einer Lösung des gefropften Polymeren beim selben Konzentrationsbereich über dieselbe Zeitdauer hinweg, wie für die nicht-gefropften polykationischen Polymere, durchgeführt. Alternativ dazu kann die erste Schicht des polykationischen Polymeren durch das mit wasserlöslichem nichtionischen Polymer gefropfte polykationische Polymer, wie PLL-g-PEO, ersetzt werden, und die zweite Schicht dieses gefropften polykationischen Polymeren kann eingeschlossen oder weggelassen werden. Eine äußere Schicht aus Algin kann beim selben Konzentrationsbereich über dieselbe Zeitdauer hinweg, wie für die innere, hinzugefügt werden, oder nicht.

Die in jeder Mikrokapsel verwendete Anzahl von Schichten kann verwendet werden, um mehrere für die Transplantation interessante Parameter festzulegen. Der Stand der Technik offenbart die Verwendung von Mikrokapseln mit 3 Schichten, wie in O'Shea und Sun (1986) beschrieben wurde. Die Anzahl von Schichten kann durch Hinzufügen von nachfolgenden alternierenden Schichten aus polyanionischen Polysacchariden und polykationischen Polypeptiden erhöht werden. Die auf die wasserlöslichen nichtionischen Polymere gefropften polykationischen Polymere sollten wenigstens als die letzte oder die zur letzten nächstgelegene Schicht der Mikrokapsel verwendet werden, und müssen zumindest die äußerste polykationische Schicht bilden.

Das Erhöhen der Anzahl von Schichten verringert die Permeabilität der Mikrokapseln. Somit kann die Permeabilität gesteuert werden, um die Diffusion durch die Mikrokapselmembran hindurch selektiv zu ermöglichen. Die Hinzufügung von wasserlöslichen nichtionischen Polymeren zu der polykationischen Polypeptidschicht steigert die Permeabilität. Um die Immunantwort des Wirtstiers gegen die innerhalb dieser Mikrokapseln eingekapselten Zellen, wie Insulin-herstellende Fremdtransplantat-Inselzellen, auszuschalten, ist es deshalb notwendig, diesem Permeabilitätszuwachs zu begegnen. Ein bevorzugtes Verfahren besteht darin, zwei zusätzliche Schichten auf die Oberfläche der Mikrokapsel hinzuzufügen. Dies bringt die Permeabilität zurück zu dem Wert, welcher in den im Fachgebiet beschriebenen 3-Schicht-Mikrokapseln zu finden ist, welche keine gefropften wasserlöslichen nichtionischen Polymere besitzen.

Darüber hinaus steigert die Erhöhung der Anzahl von Schichten der Mikrokapselmembran die Festigkeit und Stabilität der Mikrokapseln. Diese Stabilität allerdings muß mit der, durch die vermehrten Schichten verursachten, Verringerung der Permeabilität abgestimmt werden. Somit wird zur Verwendung bei der Einkapselung lebender Zellen, die ein gewünschtes Produkt herstellen, wenn sie in ein Wirtstier transplantiert sind, eine 5-Schicht-Mikrokapsel gemäß

dieser Erfindung am stärksten bevorzugt, wobei es egal ist, ob sie sowohl mit nicht-gepfropftem und gepfropftem polykationischen Polymer oder lediglich mit gepfropftem polykationischen Polymer hergestellt wurde.

- 5 In diesem Schritt können durch die obengenannten Verfahren gebildete Mikrokapseln degelliert werden, um überschüssiges gelliertes polyanionisches Polysaccharid zu entfernen, welches das eingekapselte Material unmittelbar umgibt. Dieses Verfahren ist jedoch kein notwendiger Schritt, und die Mikrokapseln werden ohne Degellierung gut funktionieren. Falls ein Degellieren erwünscht ist, können auf dem Fachgebiet beschriebene Standardverfahren, wie
10 die Inkubation in einer Natriumcitratlösung, angewandt werden; O'Shea und Sun (1986).

6. Implantation von Mikrokapseln

- Mikrokapseln werden in einer für eine Injektion kompatiblen Lösung, wie isotonischer
15 Salzlösung, Puffer oder Gewebekulturmedium, suspendiert. Die Mikrokapseln können mittels Standardtechniken in die Bauchhöhle eines Wirtstieres implantiert werden. Darüber hinaus können sie an jeglicher Stelle des Körpers implantiert werden, welche einen genügenden Kreislauf der Produkte des eingekapselten Materials bereitstellt, um das metabolische Funktionieren dieser Produkte zu gestatten. Bei Mikrokapseln, welche Insulin-herstellende
20 Inselzellen enthalten, werden zum Beispiel intramuskuläre Stellen eine ausreichende Exposition an das Blutkreislaufsystem gewähren, um die effektive Verwendung des Insulins zu ermöglichen.

Beispiel 1

25 Aktivierung von PEO unter Verwendung von Carbodiimidazol

- Es wurden drei getrennte Reaktionen durchgeführt, wobei jede PEO von einer unterschiedlichen Molekulargewichtsklasse einsetzte. Es wurde jeweils 1 Millimol PEO-5K (5 000 d), PEO-10K (10 000 d) und PEO-18,5K (18 500 d) verwendet. Das PEO-5K-Material war
30 Monomethoxy-endterminiert, somit besaßen diese Polymere lediglich eine terminale aktivierbare Hydroxylgruppe, wodurch Quervernetzungsreaktionen in dem Kopplungsschritt minimiert wurden. 50%ige Lösungen dieser Polymere wurden in wasserfreiem Aceton angesetzt, welches über Nacht über 4 Å-Molekularsiebe getrocknet worden war, und zu ihnen wurden 5 Millimol Carbodiimidazol (CDI) gegeben. Die Reaktionsmischungen wurden 2 Stunden lang bei
35 Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischungen wurden dann viermal mit 60 ml wasserfreiem Aceton gewaschen, indem die Lösung zur Fällung auf 0°C abgekühlt wurde, dekantiert wurde, frisches Lösungsmittel zugegeben wurde, und zur erneuten Auflösung auf 22°C erwärmt wurde. Das Produkt wurde danach lyophilisiert und aufbewahrt.

Beispiel 2

Aktivierung von PEO unter Verwendung von Sulfonylchloriden

Es wurden drei getrennte Reaktionen durchgeführt, wobei jede PEO von einer unterschiedlichen Molekulargewichtsklasse einsetzte. Es wurde jeweils 1 Millimol PEO-5K, PEO-10K und PEO-18,5K verwendet. Das PEO-5K-Material war Monomethoxy-endterminiert; somit besaßen diese Polymere lediglich eine terminale aktivierbare Hydroxylgruppe, wodurch Quervernetzungsreaktionen in dem Kopplungsschritt minimiert wurden. 50%ige (w/v) Lösungen dieser Polymere wurden in wasserfreiem Aceton angesetzt, welches über Nacht über 4 Å-Molekularsiebe getrocknet worden war. Die Lösungen wurden auf 4°C gekühlt, und 5 Millimol Triflylchlorid oder PFBS wurden diesen Lösungen zusammen mit 10 Millimol Pyridin zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mechanisch gerührt, wonach sie zweimal mit je 60 ml Methanol, enthaltend 0,2 ml konzentrierte HCl, dreimal mit je 60 ml Methanol mit 50 µl HCl, und schließlich mit reinem Methanol gewaschen wurde. Die Waschungen wurden durch Solubilisieren bei 40°C und Fällung bei 4°C, gefolgt von Zentrifugation bei 1000 rcf durchgeführt. Mittels Ultraviolett-Spektrophotometrie wurde überprüft, daß die letzte Waschung frei von jeglichem verbleibenden Pyridin ist. Das Produkt wurde lyophilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

20 Beispiel 3

Aktivierung von PEO unter Verwendung von p-Nitrophenylchlorcarbonat

Es wurden drei getrennte Reaktionen durchgeführt, wobei jede PEO von einer unterschiedlichen Molekulargewichtsklasse einsetzte. Es wurde jeweils 1 Millimol PEO-5K, PEO-10K und PEO-18,5K verwendet. Das PEO-5K-Material war Monomethoxy-endterminiert; somit besaßen diese Polymere lediglich eine terminale aktivierbare Hydroxylgruppe, wodurch Quervernetzungsreaktionen in dem Kopplungsschritt minimiert wurden. 50%ige Lösungen dieser Polymere wurden in Aceton angesetzt, welches über Nacht über 4 Å-Molekularsiebe getrocknet worden war. Die Lösungen wurden auf 4°C abgekühlt, und jeweils 5 Millimol Pyridin und Triethylamin und 5 Millimol p-Nitrophenylchlorcarbonat (Chlorocarb) wurden zugegeben. Die Mischungen wurden mechanisch gerührt und man ließ die Reaktion 2 Stunden lang bei Raumtemperatur voranschreiten. Die Reaktionsmischung wurde dann mit kaltem Aceton gewaschen, indem 60 ml Aceton bei Raumtemperatur zugegeben wurden, auf 4°C abgekühlt und bei 1000 rcf zentrifugiert wurde. Das Waschen wurde einmal mit Aceton, dann mit einer 5%igen Essigsäurelösung in Dioxan, und schließlich mit Methanol wiederholt. Das Produkt wurde lyophilisiert und aufbewahrt.

Beispiel 4

Kopplung von aktiviertem PEO an PLL

20 mg Poly-(L-Lysin) (PLL), Molekulargewicht etwa 17 000, wurden zu jeder 50%igen (w/v) Lösung der obenstehenden aktivierten Polymere in 500 mM Natriumboratpuffer (pH 9) 24 Stunden lang zugegeben. Die Kopplungsreaktion wurde durch Abblocken unter Verwendung von 0,36 ml 14 M Mercaptoethanol gestoppt. Das Abblocken wurde 10 Stunden lang voranschreiten gelassen.

Das auf PLL gefropfte PEO-5K und das auf PLL gefropfte PEO-10K bildeten klare Lösungen. Andererseits führte das auf PLL gefropfte PEO-18,5K zu der Bildung eines makromolekularen Netzwerks von sehr hohem Molekulargewicht, welches die Konsistenz eines Gels aufwies. Einige Abschnitte dieses Gels waren bei weiterer Verdünnung löslich, aber manche quervernetzte Bereiche blieben unlöslich.

Es wurde kein Versuch unternommen, das nicht-umgesetzte PEO vom PLL-g-PEO zu trennen. Das Ausmaß der Reaktion wurde unter Verwendung von spektrophotometrischer Titration der Amingruppen abgeschätzt, wobei die Amingruppen mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure umgesetzt wurden, wodurch ein Produkt, welches bei 440 nm absorbiert, gebildet wurde.

Beispiel 5

Beziehung des Molekulargewichts des wasserlöslichen nichtionischen Polymers zur Permeabilität der Mikrosphären

Es wurde festgestellt, daß die Verwendung des auf das polykationische Polymer gefropften wasserlöslichen nichtionischen Polymers die Permeabilität der Mikrokapseln beeinflusst. Die Mikrosphären wurden unter Verwendung von auf PLL gefropftem PEO von variierenden Molekulargewichten als Außenschicht einer Zweischicht-Mikrosphäre gebildet. Das Verhältnis der Größe des verwendeten PEO zur Permeabilität der Mikrosphären wurde untersucht.

Zur Mikrosphärenherstellung wurden 5 ml Algin-Lösung mit 100 µl ^{125}I -markiertem BSA gemischt. Die Mikrosphären wurden gemäß Standardverfahren hergestellt. PLL-g-PEO mit PEO-Ketten von 5 000 d, 10 000 d und 100 000 d wurden als die Außenschicht verwendet. Es wurden Kontrollsphären mit nicht-gefropftem PLL als der Außenschicht gebildet. Die Mikrosphären wurden mit Citrat degelliert. Die degellierten Mikrosphären wurden in 10 ml Citratlösung inkubiert, welche periodisch mittels Proben auf die Gegenwart von ^{125}I -Albumin untersucht wurde, welches durch die Membran sezerniert worden war. Für diese Probenuntersuchung wurden 1 ml große Aliquots in einem Gamma-Szintillationszähler ausgezählt.

Wie in der Figur 1 ersichtlich, nahm die Permeabilität der Mikrosphären direkt proportional zur Größe der PEO-Komponente der Außenschicht zu, wobei die Kontrollsphären mit dem nicht-gepfropften PLL am wenigsten permeabel waren.

- 5 Die Auswirkungen der Gegenwart von PEO auf die Permeabilität konnten durch Erhöhen der Anzahl der verwendeten Schichten zur Bildung der Mikrosphären umgekehrt werden. Gemäß Standardverfahren wurden Mikrosphären mit zwei bis vier Schichten gebildet. Wie aus der Figur 2 ersichtlich ist, hatten Mikrokapseln mit PEO, welche 4 Schichten besaßen, wobei die innere polykationische Schicht aus nicht-gepfropftem PLL bestand, die gleichen Permeabilitätsmerkmale wie die Kontrollmikrokapseln mit 3 Schichten. Somit veränderte das Variieren der Anzahl von Schichten die Permeabilitätsmerkmale der Mikrosphären, und die Erhöhung der Anzahl von Schichten, unter Verwendung einer inneren Schicht aus nicht-gepfropftem PLL, führte die Mikrokapseln zu ihrer ursprünglichen Permeabilität, bezogen auf die Standard-Mikrokapsel, zurück.

15

Beispiel 6 Implantation

- 20 Es wurden etwa 0,5 ml der Mikrokapseln für jede Probe verwendet. Die Proben wurden zweimal in jeweils 10 ml isotonischer Salzlösung gewaschen. Nach der letzten Waschung wurde jede Probe der Mikrokapseln in 5 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (0,2 M), pH 7,4, (PBS) suspendiert und in zwei gleiche Teile aliquotiert. Für jede Zusammensetzung wurden zwei Tiere, 16-20 Wochen alte männliche Schweizer Sprague-Dawley-Mäuse, verwendet. Die Implantationen wurden unter Verwendung einer Nadel mit einer 15er-Eicheinteilung (15 gauge
- 25 needle) intraperitoneal (i.p.) vorgenommen. Die Tiere befanden sich unter Etherbetäubung. Mikrokapseln mit einer äußersten Schicht aus PLL ohne die gepfropften wasserlöslichen nichtionischen Polymere wurden als Kontrollen verwendet.

Beispiel 7

- 30 Charakterisierung implantierter Mikrokapseln

- Nach einer Woche wurden die Implantate unter Verwendung von Bauchhöhlenspülung wiedergewonnen. 5 ml PBS, enthaltend 10 U/ml Heparin, wurden mit Druck unter Verwendung einer Nadel mit einer 22er-Eicheinteilung injiziert. Die Mikrokapseln wurden unter Verwendung einer Transferpipette durch ein kleines, in dem Muskellappen über der Bauchhöhle angefertigtes, Loch zurückgewonnen.
- 35

a) Zellzählungen

Es wurde eine unmittelbare Zählung der in der Flüssigkeit in Verbindung mit den Mikro kapseln
wiedergewonnenen freien Zellen vorgenommen. Diese Zellen wurden 2 Stunden lang in
5 Polystyrol-Petrischalen inkubiert und danach gewaschen und in 2%igem Glutaraldehyd fixiert.
Es wurde festgestellt, daß diejenigen Zellen, welche an der Petrischale adhärten, nahezu
gleichförmig Makrophagen waren, wie unter Verwendung einer Technik mit monoklonalen
Antikörpern und sekundärer Fluoreszenz aufgeklärt wurde. Der primäre Antikörper war ein
Ratten-anti-Maus-Makrophagen-Antikörper, Klon #M1-70.15 von Sera-Lab, der von Accurate
10 Chemicals erhalten wurde. Der sekundäre Antikörper war ein mit Fluorescein konjugierter
polyklonaler Ziegen-anti-Ratten-IgG-Antikörper, welcher von Accurate Chemical erhalten
wurde. Nach der Antikörperbehandlung wurden die Proben mittels Fluoreszenzmikroskopie
betrachtet. Etwas von der direkt gewonnenen Bauchhöhlenwaschflüssigkeit und einige Kon-
trollmikro kapseln, welche mit Zellen bedeckt waren, wurden ebenfalls unter Verwendung der
15 Antikörper-Fluoreszenztechnik behandelt, und es wurde qualitativ beurteilt, daß sie zu etwa
50 % Makrophagen waren.

Die Ergebnisse, welche in der Figur 4 gezeigt sind, zeigen, daß die Anzahl frei flottierender
Makrophagen in der Bauchhöhlenflüssigkeit durch die Verwendung der Produkte dieser
20 Erfindung verringert wurde. Diese Figur zeigt Zellzählungen aus den Proben. Wie aus dieser
Figur ersichtlich ist, verringert die Anwendung der in dieser Erfindung beschriebenen
Technologie die Anzahl von Makrophagen und anderer Zellen, welche durch die Gegenwart
von Mikro kapseln in der Bauchhöhle hervorgerufen wurde. Beweise einer gewissen Fremd-
körper-Riesenzellbildung wurden in allen Proben beobachtet, welche eine Zellanhaftung auf-
25 wiesen. Variierende Fluoreszenzwerte wurden bei einigen Makrophagen beobachtet, was eine
Artefakt der nicht-gleichmäßigen Färbung sein könnte oder verschiedene Höhen der zellulären
Aktivierung reflektieren kann. Einige Zellen, die keine Makrophagen waren, wurden ebenfalls
beobachtet, aber ihre Anzahl war gering.

30 Die Anzahl der in der Bauchhöhle vorhandenen Zellen war mit dem Molekulargewicht des
gepfropften PEO invers korreliert.

b) Mikrophotographien

35 Die Figuren 5 bis 9 zeigen eine Anzahl von Mikrophotographien der zurückgewonnenen
Mikro kapseln. Die Photographien für jeden Typ von Mikro kapseln wurden durch ein 40x-
Phasenkontrast- und ein 400x-Hoffman-Optik-Mikroskop aufgenommen. Die geringere Ver-
größerung wurde verwendet, um einen breiten Querschnitt der Mikro kapseln wiederzugeben,

und die höhere Vergrößerung wurde verwendet, um die Oberfläche der Mikrokapseln zu untersuchen und die Zellanhaftung genau zu untersuchen.

5 Die in der Figur 5 gezeigten Kontrollmikrokapseln zeigten, wie erwartet, ein starkes zelluläres Überwachsen. Die Figur 5a zeigt eine Anzahl von Mikrosphären, welche durch das Überwachsen von Zellen verdunkelt sind. Die Figur 5b ist eine Version von höherer Auflösung der Figur 5a, welche individuelle Zellen auf der Oberfläche zeigt.

10 Gemäß der hier beschriebenen Erfindung hergestellte Mikrokapseln zeigten eine geringe oder keine Zellanhaftung. Dies kann durch die Klarheit und Transparenz der Mikrokapseloberflächen bei der 40fachen Vergrößerung ersehen werden. Darüber hinaus zeigen die Oberflächen der unter Verwendung der Triflylchlorid- und Chlorcarbonat-Technologie hergestellten Mikrokapseln bei 400facher Vergrößerung saubere Oberflächen.

5

PATENTANSPRÜCHE

1. Biokompatible Mikrokapsel zur Transplantation in ein Tier, wobei die Mikrokapsel eine Membran von mehr als einer Schicht umfaßt, worin die äußerste polykationische Schicht der Membran ionisch mit einer anderen Membranschicht vernetzt ist und aus einem, auf ein
10 polykationisches Polymer gepfropften, wasserlöslichen nichtionischen Polymer von zwischen 2 000 und 50 000 Dalton aufgebaut ist.
2. Mikrokapsel nach Anspruch 1, worin das wasserlösliche nichtionische Polymer Poly(ethylen-
oxid), Poly(vinylpyrrolidon), Poly(ethyloxazolin), Poly(vinylalkohol) oder ein Polysaccharid
15 ist.
3. Mikrokapsel nach Anspruch 1 oder 2, worin das Poly(ethylenoxid) zwischen 2 000 und 50 000 Dalton aufweist.
- 20 4. Mikrokapsel nach Anspruch 2, worin das Polysaccharid Dextran oder Hyaluronsäure ist.
5. Mikrokapsel nach mindestens einem der vorstehenden Ansprüche, worin das wasserlösliche nichtionische Polymer unverzweigt ist.
- 25 6. Mikrokapsel nach mindestens einem der vorstehenden Ansprüche, worin das polykationische Polymer eine polykationische Polyaminosäure, Polyethylimin oder Polyallylamin, oder ein Copolymer davon ist.
7. Mikrokapsel nach mindestens einem der vorstehenden Ansprüche, worin das polykationische
30 Polymer Polylysin, Polyornithin, Polyethylenimin, Polyallylamin oder ein gemischtes Copolymer davon ist.
8. Mikrokapsel nach Anspruch 7, worin das Polylysin zwischen 10 000 d und 75 000 d aufweist.
- 35 9. Mikrokapsel nach Anspruch 8, worin das Polylysin 17 500 d aufweist.

10. Mikrokapsel nach mindestens einem der vorstehenden Ansprüche, worin die äußerste polykationische Schicht die äußerste Schicht der Mikrokapsel ist.

5 11. Verfahren zur Herstellung eines, auf ein polykationisches Polymer gepfropften, wasserlöslichen nichtionischen Polymeren, welches folgendes umfaßt:

(a) Aktivieren der reaktiven Gruppen, welche fähig sind, an ein Kopplungsmittel auf dem wasserlöslichen nichtionischen Polymer kovalent gebunden zu werden, durch Verwendung eines Carbodiimidazol-, Sulfonylchlorid- oder Chlorcarbonat-Aktivierungsmittels, und

10 (b) Koppeln des aktivierten wasserlöslichen nichtionischen Polymers an ein polykationisches Polymer.

12. Verfahren nach Anspruch 11, worin das Aktivierungsmittel ein Sulfonylchlorid ist.

15 13. Verfahren nach Anspruch 12, worin das Sulfonylchlorid Triflylchlorid, Tresylchlorid, Tosylchlorid oder Pentafluorbenzolsulfonylchlorid ist.

20 14. Verfahren nach Anspruch 11, worin das Chlorcarbonat p-Nitrophenylchlorcarbonat, 2,4,5-Trichlorphenylchlorcarbonat oder N-Hydroxysuccinamidchlorcarbonat ist.

15. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 11 bis 14, worin die reaktiven Gruppen Hydroxyle, Carboxyle, Diole, Aldehyde, Amine oder Thiole sind.

25 16. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 11 bis 15, worin die nichtionischen wasserlöslichen Polymere wie in mindestens einem der Ansprüche 2 bis 5 definiert beschaffen sind.

30 17. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 11 bis 16, worin die polykationischen Polymere wie in mindestens einem der Ansprüche 6 bis 9 definiert beschaffen sind.

18. Verfahren zur Herstellung einer biokompatiblen Mikrokapsel, wie in mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 definiert, welches folgendes umfaßt:

35 a) Aktivieren der reaktiven Gruppen, welche fähig sind, an ein Kopplungsmittel auf einem wasserlöslichen nichtionischen Polymer kovalent gebunden zu werden, und

- b) Koppeln des aktivierten wasserlöslichen nichtionischen Polymeren an ein polykationisches Polymer unter Bildung eines Pfropfcopolymeren,
- c) ionisches Vernetzen des Pfropfcopolymeren an eine äußerste Schicht einer Mikrokapsel-Membran.
19. Verfahren nach Anspruch 18, worin das Aktivierungsmittel ein Carbodiimidazol, Sulfonylchlorid oder Chlorcarbonat ist.
20. Zusammensetzung, geeignet zur Behandlung einer Oberfläche, um deren Biokompatibilität und Beständigkeit gegen zelluläres Überwachsen zu verbessern, wobei die Zusammensetzung folgendes umfaßt:
- eine wäßrige Lösung eines pharmazeutisch annehmbaren wasserlöslichen Blockcopolymeren, umfassend ein wasserlösliches nichtionisches Polymer von zwischen 2 000 und 50 000 Dalton, das auf ein polykationisches Polymer gepfropft ist.
21. Zusammensetzung von Anspruch 20, worin das Blockcopolymer fähig zur ionischen Vernetzung an die Oberfläche ist.
22. Zusammensetzung, wie beansprucht in Anspruch 20 oder 21, wobei das polykationische Polymer ein Polypeptid, ein Polyimin oder ein Polyallylamin ist und ein Molekulargewicht von 10 000 bis 75 000 d aufweist.
23. Zusammensetzung von Anspruch 22, worin das polykationische Polymer Polylysin, Polyornithin, Polyethylenimin, Polyallylamin, gemischte Copolymere davon oder Mischungen daraus ist.
24. Zusammensetzung, wie beansprucht in mindestens einem der Ansprüche 20 bis 23, worin das nichtionische wasserlösliche Polymer Poly(ethylenoxid), Poly(vinylpyrrolidon), Poly(ethyl-oxazolin), Poly(vinylalkohol) oder Polysaccharid ist und ein Molekulargewicht zwischen 2 000 und 50 000 d aufweist.
25. Zusammensetzung von mindestens einem der Ansprüche 20 bis 24, worin das Blockcopolymer durch Pfropfen von mehr als einem nichtionischen Polymer auf ein polykationisches Polymergrundgerüst gebildet wird.

26. Verfahren zur Verbesserung der Biokompatibilität einer Mikrokapsel, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung von mindestens einem der Ansprüche 20 bis 25 einer wäßrigen Lösung, welche die Mikrokapsel enthält, zugegeben wird.
- 5 27. Verfahren nach Anspruch 26, worin die Verbesserung der Biokompatibilität nach der Behandlung mit dem Pfcopolymeren als mindestens eines unter folgendem nachgewiesen wird:
- 10 a) Verminderung des Anhaftens von Zellen aus einem Tier an eine Mikrokapsel nach der Behandlung;
- b) Verminderung der Immunantwort eines Tiers gegen eine Mikrokapsel nach der Behandlung; oder
- 15 c) Verminderung des Überwachsens einer Mikrokapsel durch Zellen aus einem Tier nach der Behandlung.
- 20 28. Verfahren zur Behandlung einer Oberfläche, um deren Biokompatibilität und Beständigkeit gegen zelluläres Überwachsen und Proteinanheftung zu verbessern, welches folgendes umfaßt:
- 25 Anheften eines wasserlöslichen Blockcopolymeren, umfassend ein wasserlösliches nicht-ionisches Polymer von zwischen 2 000 und 50 000 Dalton, das an ein polykationisches Polymer gepfropft ist, an die Oberfläche.
29. Verfahren nach Anspruch 28, worin das Blockcopolymer durch ionische Vernetzung an der Oberfläche anhaftet.
- 30 30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, worin das polykationische Polymer ein Polypeptid, ein Polyimin oder ein Polyallylamin ist und ein Molekulargewicht von 10 000 bis 75 000 d aufweist.
- 35 31. Verfahren nach Anspruch 30, worin das polykationische Polymer Polylysin, Polyornithin, Polyethylenimin, Polyallylamin, ein gemischtes Copolymer davon oder eine Mischung daraus ist.

32. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 28 bis 31, worin das nichtionische wasserlösliche Polymer Poly(ethylenoxid), Poly(vinylpyrrolidon), Poly(ethyloxazolin), Poly(vinylalkohol) oder Polysaccharid ist und ein Molekulargewicht von 2 000 bis 50 000 aufweist.
- 5 33. Verfahren nach Anspruch 28, worin die Verbesserung der Biokompatibilität nach der Behandlung mit dem Pfropfcopolymeren als mindestens eines unter folgendem nachgewiesen wird:
- 10 a) Verminderung des Anhaftens von Zellen aus einem Tier an die Oberfläche nach der Behandlung;
- b) Verminderung der Immunantwort eines Tiers gegen die Oberfläche nach der Behandlung;
- 15 oder
- c) Verminderung des Überwachsens der Oberfläche durch Zellen aus einem Tier nach der Behandlung.
- 20

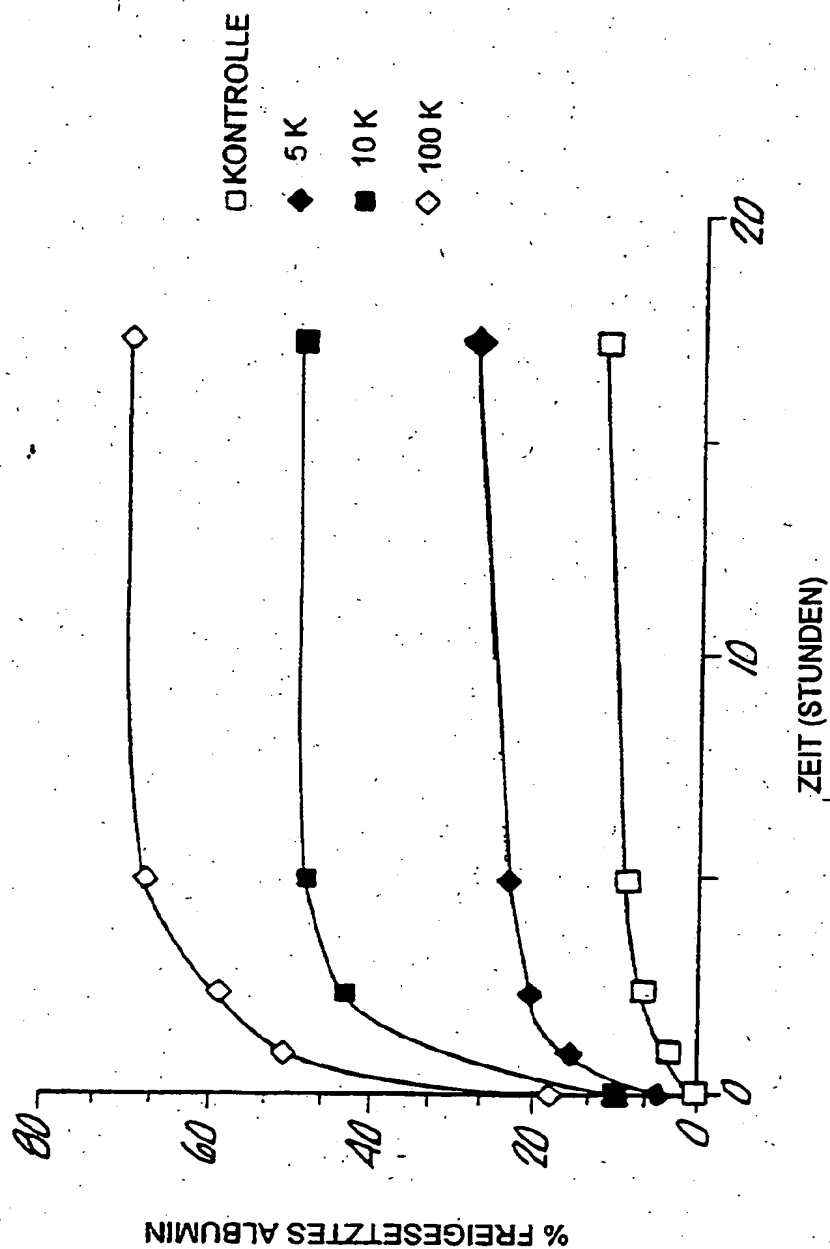
PERMEABILITÄT ZWEISCHICHTIGER MIKROSPHÄREN
MIT UNTERSCHIEDLICHEN PEO-PFROPFUNGEN IN
DER ÄUßEREN SCHICHT

FIG. 1.

STEUERUNG DER PERMEABILITÄT DURCH DIE ERSTE SCHICHT

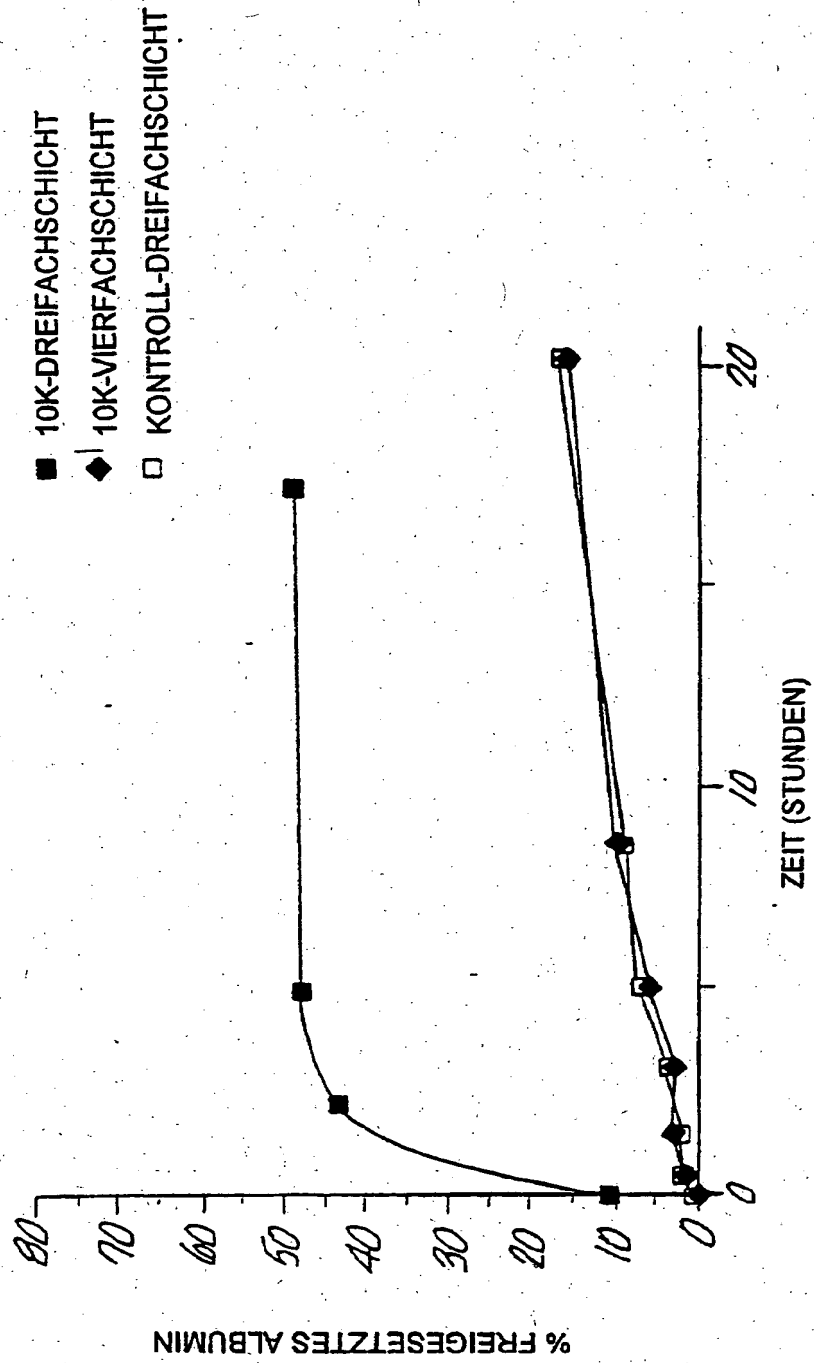


FIG. 2.

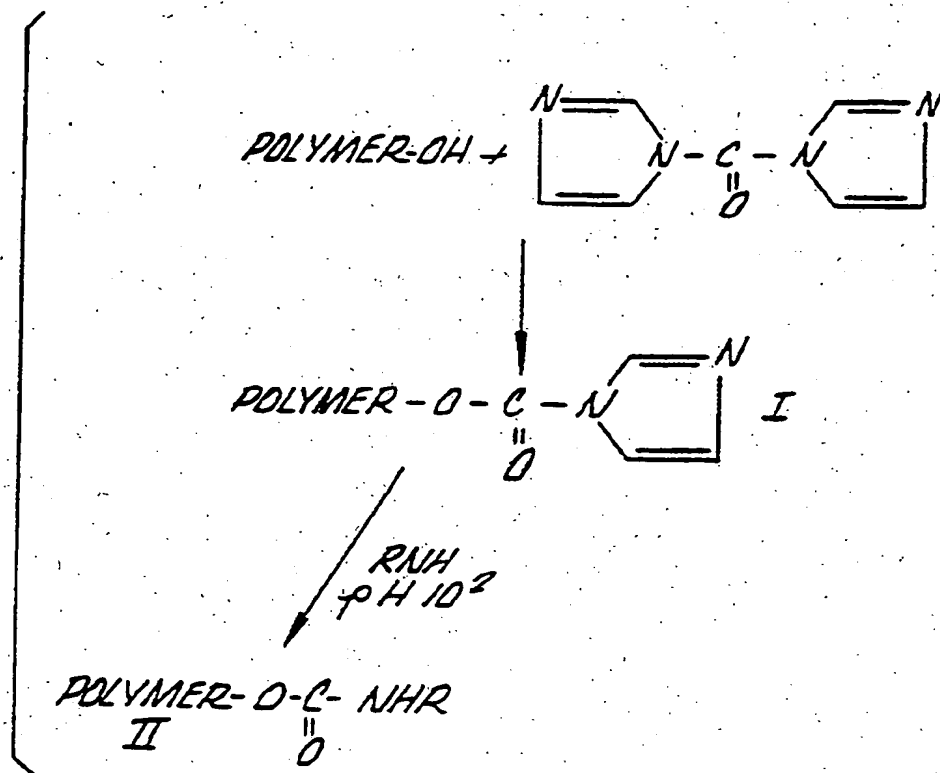


FIG. 3.

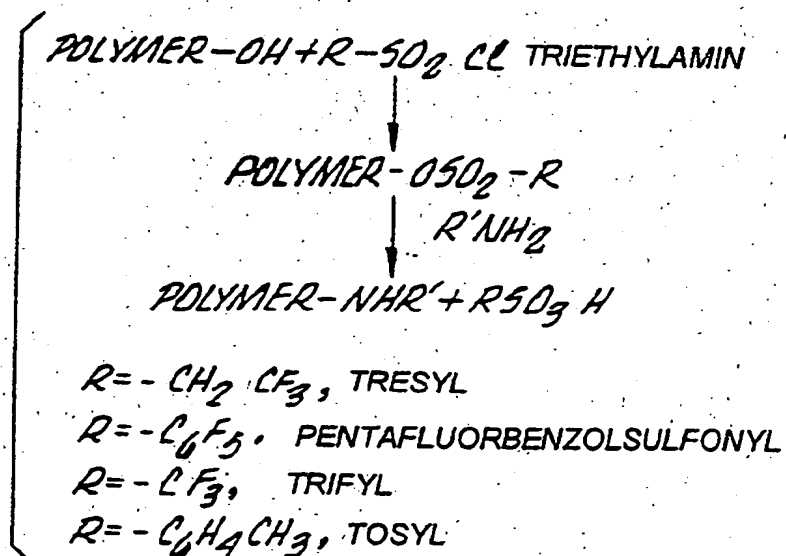


FIG. 4.

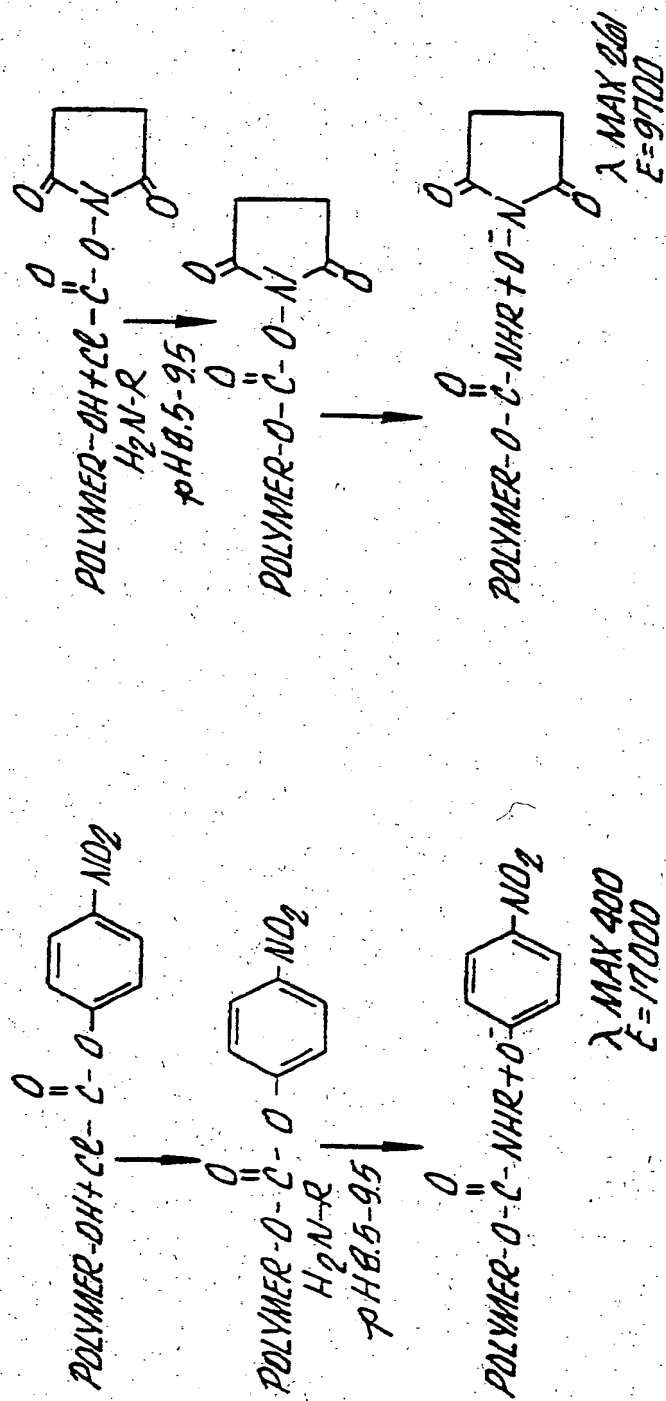


FIG. 5B.

FIG. 5A.

5/12

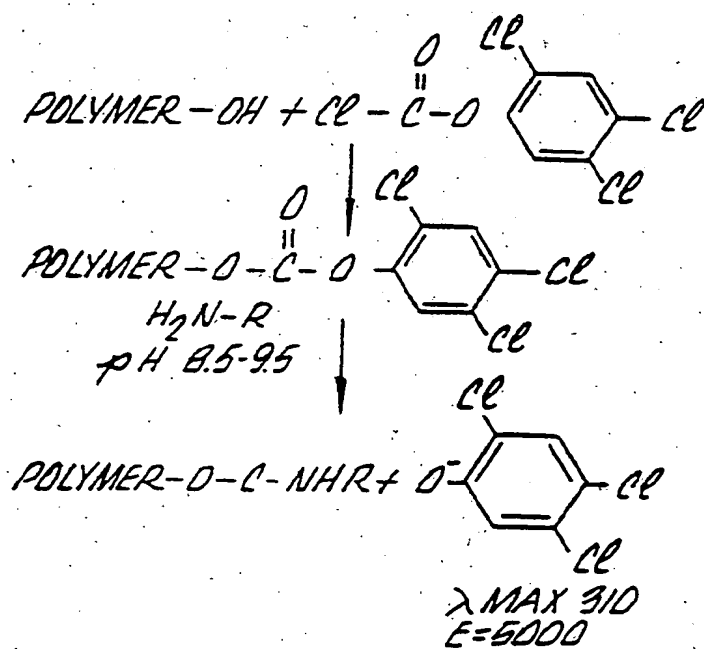
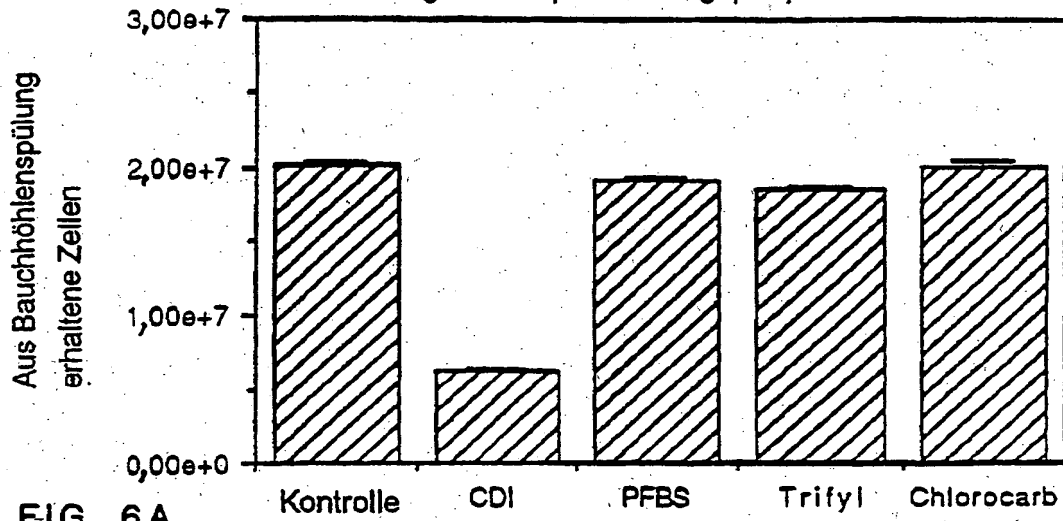
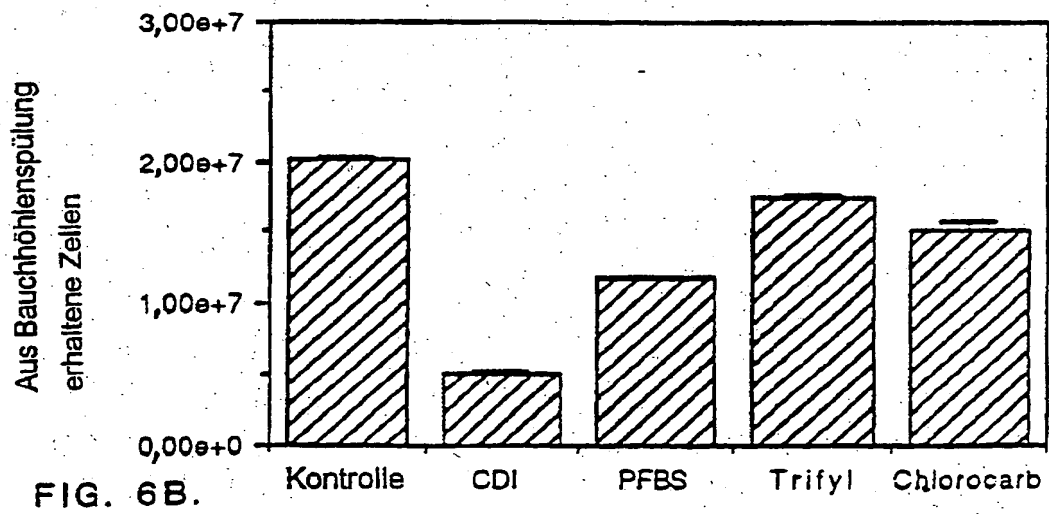


FIG. 5C.

Zellzählungen für die Poly(L-Lysin)-Kontrolle und verschiedene
vierschichtige Mikrosphären mit gepropftem 5K-PEO



Zellzählungen für die Poly(L-Lysin)-Kontrolle und verschiedene
vierschichtige Mikrosphären mit gepropftem 10K-PEO



Zellzählungen für die Poly(L-Lysin)-Kontrolle und verschiedene
vierschichtige Mikrosphären mit gepropftem 18,5K-PEO

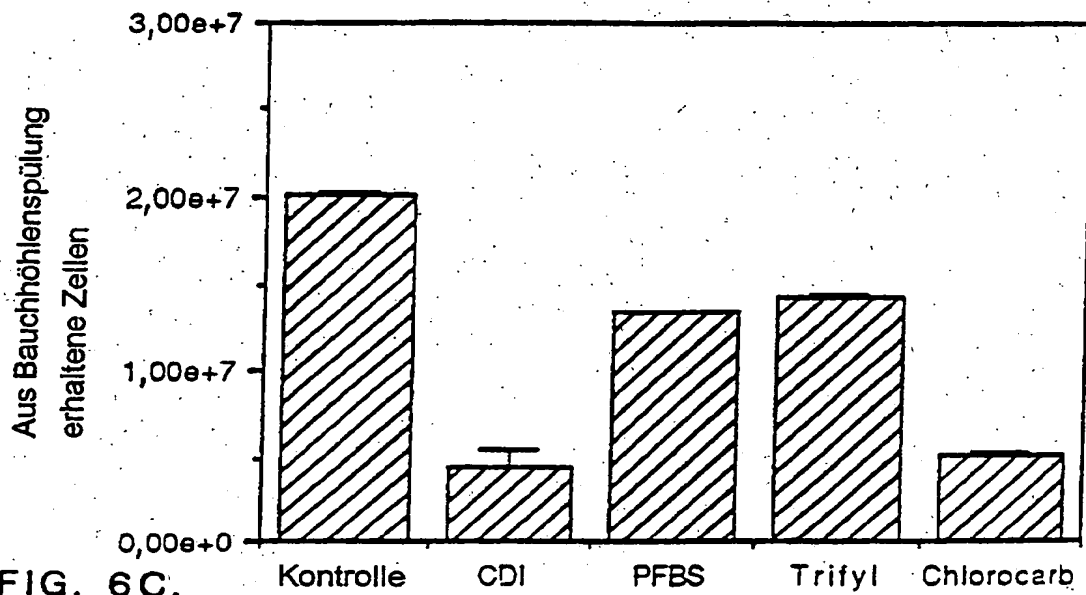


FIG. 6C.

8/12

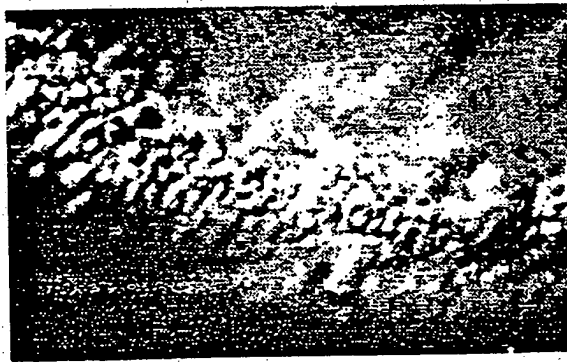


FIG. 7B.

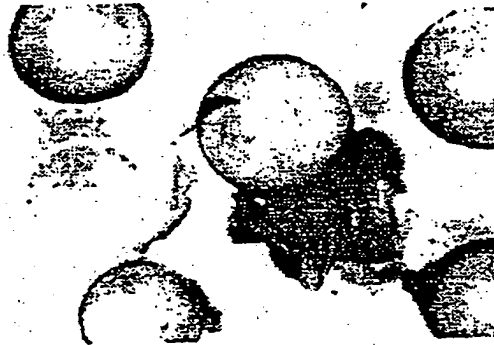


FIG. 7A.

9/12

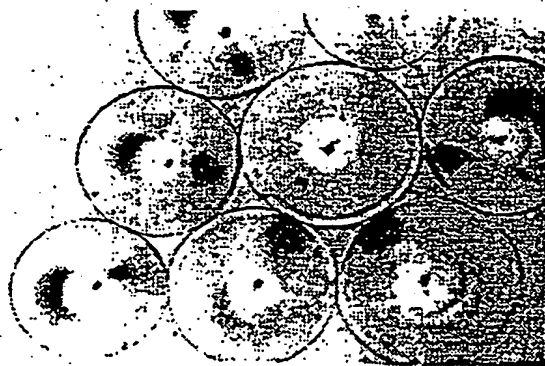


FIG. 8C.

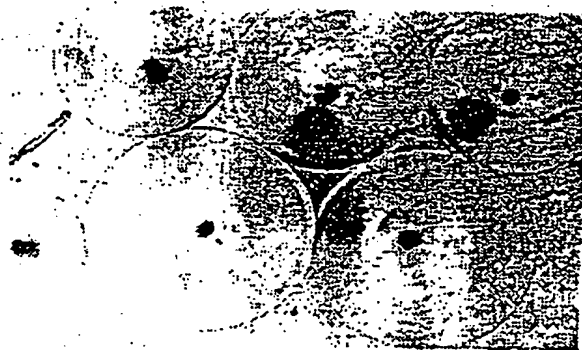


FIG. 8B.

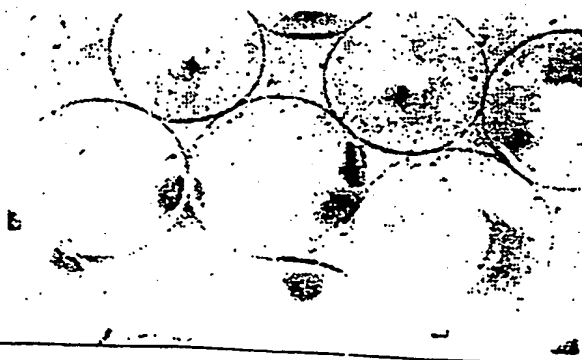


FIG. 8A.

10/12



FIG. 9E.

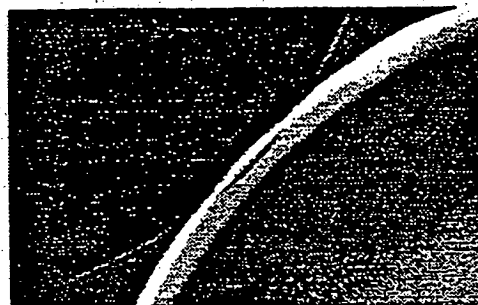


FIG. 9F.

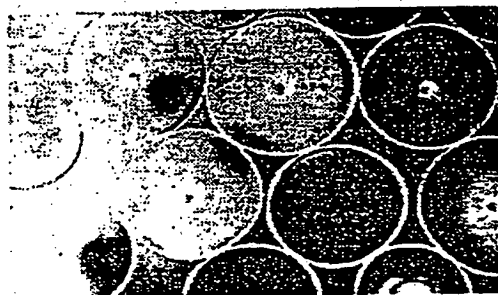


FIG. 9C.



FIG. 9D.

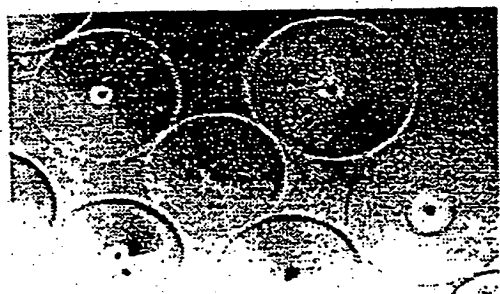


FIG. 9A.



FIG. 9B.



FIG. 10C.

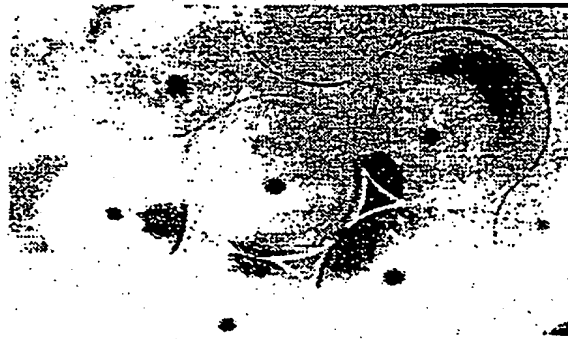


FIG. 10B.



FIG. 10A.



FIG. 11A.

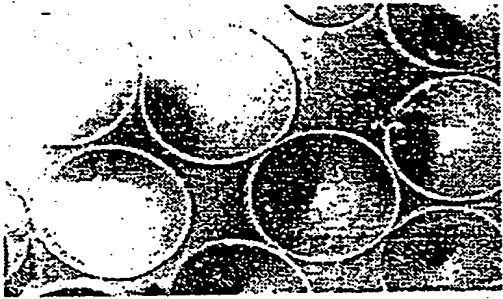


FIG. 11C.

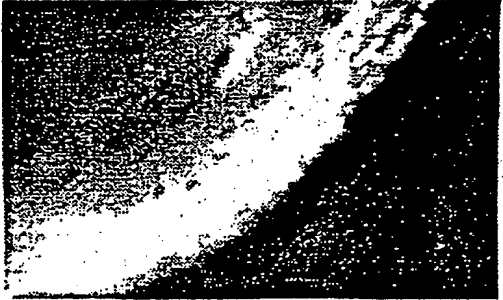


FIG. 11E.

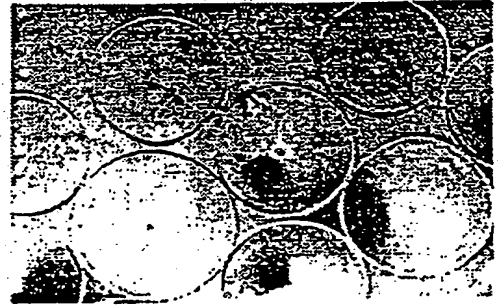


FIG. 11B.

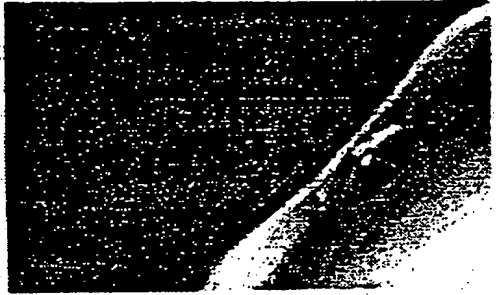


FIG. 11D.



FIG. 11F.